

Genetische Untersuchungen an Chlamydomonas reinhardi

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Helga Ranneberg

aus

Kemnath/Opf.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

1968

1968 # 340

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 22. 5. 1968

Dekan: Professor Dr. W. Haupt
Erstberichterstatter: Dozent Dr. C. G. Arnold
Zweitberichterstatter: Professor Dr. W. Haupt

Sonderdruck aus:

Molec. Gen. Genetics, 101, 212-216 (1968)
Z, Pflanzenphysiol., Bd. 59, 7-11 (1968)
Arch. Mikrobiol., Bd. 61, 254-260 (1968)
Molec. Gen. Genetics, 102, 27-38 (1968)

Die Wirkung von Äthylmethansulfonat
auf *Chlamydomonas reinhardi*

H. RANNEBERG und C. G. ARNOLD

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Eingegangen am 28. Dezember 1967

Summary. Ethylmethane sulfonate (EMS) is known to cause a considerably high mutation rate in higher plants. In our experiments with *Chlamydomonas reinhardi* however, the mutagenic effect was unexpectedly low, whereas the toxic effect was quite remarkable. It is supposed that the reason for the low rate of mutants is the high toxicity, since non-toxic EMS concentrations induce no mutants. The toxic effect on *Chlamydomonas* cells is caused not only by the products of hydrolysis of the EMS, but also by the EMS itself. The damaged cells begin to bleach, furthermore they are not able to deliver their daughter cells. To a certain degree both effects are reversible. Finally it was found that the sensitivity to EMS was higher in cells of the mating type — than it was in those of the + mating type.

Einleitung

Äthylmethansulfonat gehört zu den wichtigsten chemischen Mutagenen. Es bewirkt bei höheren Pflanzen die Erzeugung einer erstaunlich hohen Zahl von Mutanten. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Äthylmethansulfonat (ÄMS) auf Einzeller zu studieren. Dabei fiel die Wahl auf *Chlamydomonas reinhardi*, die viele Eigenschaften besitzt, die sie zu biochemischen und genetischen Versuchen geeignet erscheinen lassen.

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit dem Stamm C 137 durchgeführt, den wir vom Max Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln-Vogelsang erhielten. Er stammt letztlich jedoch aus dem Labor R. SAGERs.

Bezüglich der Nährmedien richteten wir uns, von einigen Änderungen abgesehen, nach den Vorschriften von LEVINE und EBERSOLD (1958). Bei den Versuchen mit Agarnährböden wurden die *Chlamydomonas*-Zellen zunächst auf einem festen Medium angezogen, 1 Tag vor Versuchsbeginn jedoch in Phosphat-Puffer $6,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$ suspendiert. Die über Nacht ausgehungrten Zellen wurden gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. In der Regel wurde ÄMS erst nach dem Sterilisieren zugesetzt. Bei den Versuchen zur Einwirkung von ÄMS auf Flüssigkeitskulturen wurden die Zellen ebenfalls zunächst von Agarkulturen abgeimpft und in sterilem destillierten Wasser suspendiert. 2 Std danach wurde ÄMS zugesetzt. Nach verschieden langer Einwirkungszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und erneut in destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Entsprechende Anteile der Suspension wurden auf Agarplatten mit Vollmedium ausgestrichen.

Bei der Untersuchung des Wachstumsverlaufs wurden die *Chlamydomonas*-Zellen zunächst in flüssiges Minimalmedium gebracht, wo sie bis zum Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase verblieben. Dann wurden die Zellen gezählt, eine bestimmte Anzahl wurde in Fernbachkolben gebracht, die Minimalmedium plus ÄMS verschiedener Konzentrationen enthielten. Während der ÄMS-Einwirkung wurden die Kolben auf einer Schüttelmaschine gehalten. Jeden 3. Tag wurde eine bestimmte Menge der Suspension zum Zählen in einer Neubauer-Erythrozyten-Zählkammer entnommen. Die auszuzählenden Zellen wurden in der Zählkammer durch Chloroform abgetötet.

Die Überprüfung der Kolonien auf Mangelmutanten erfolgte nach der üblichen Stempel-methode von J. und E. M. LEDERBERG (1952). Es erwies sich jedoch als günstig, den Saft des Stempels noch mit einer Schicht Chromatographierpapier zu überziehen.

Die Temperatur des Klimaraumes betrug 25°C, die Lichtintensität etwa 5000 Lux.

Ergebnisse

Wirkung von ÄMS auf Chlamydomonas-Agarkulturen

Zunächst wurde versucht, die ÄMS-Grenzkonzentration zu bestimmen, die von den Zellen ohne merkliche Schädigung vertragen werden kann. Sie lag bei den Versuchen mit Minimalmedium bei 0,03—0,04% ÄMS. Wurde dagegen das Vollmedium benutzt, so stieg die Grenzkonzentration auf 0,15—0,16% ÄMS. Bei Verwendung von höheren ÄMS-Konzentrationen war die Überlebensrate nur noch sehr gering, sie ist zahlenmäßig nicht erfaßt worden.

Die überlebenden Zellen wurden auf Resistenz-, Kolonieform- und Stoffwechselmutanten überprüft. Dabei ergab sich, daß die Mutationshäufigkeit außerordentlich gering ist. Es konnte nur eine einzige Mutante isoliert werden. Sie war bei den Versuchen mit Minimalagar aufgetreten, dem 0,065% ÄMS zugegeben war. Diese Mutante ist noch gegenüber 0,08% ÄMS-Beimischung zum Minimalagar resistent. Ihr wesentlichstes Merkmal ist aber eine deutliche Überempfindlichkeit gegen Acetat. Eine Zugabe von 0,2% Natriumacetat zum Nährmedium verhindert ihr Wachstum vollkommen.

Wirkung von ÄMS auf suspendierte Chlamydomonas-Zellen

Zuerst wurden Versuche mit einer hohen ÄMS-Konzentration durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß eine 0,1%ige Lösung bereits nach 30 min ein deutliches Verblassen der Zellsuspension bewirkte. Nach 2 Std waren die Zellen völlig ausgebleicht. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Empfindlichkeit des + und — Stammes gegenüber ÄMS. Während die Zellen des Paarungstyps + noch nach einer Behandlungszeit von 1 Std unverändert wachsen konnten, hatten die — Zellen zu diesem Zeitpunkt ihr Wachstum bereits eingestellt.

NEČASEK (1966) hatte bei Corynebakterien durch Verringerung der ÄMS-Gabe, verbunden mit einer Verlängerung der Einwirkungszeit, die Mutationsrate um das 30fache steigern können. Unsere Algen wurden deshalb in einer 0,025%igen ÄMS-Lösung suspendiert und die Einwirkungszeit wurde von 1—12 Std variiert. Dabei lag die kritische Zeit, bei der ein unverändertes Wachstum nicht mehr gegeben ist, zwischen 8 und 9 Std. Auch hier zeigten sich die + Zellen widerstandsfähiger als die — Zellen.

Die Kolonien, die nach längerer Einwirkung als 1 Std bei 0,1%iger ÄMS-Lösung und nach längerer Einwirkung als 9 Std bei 0,025%iger Lösung entstanden waren, wurden wieder auf Resistenz-, Kolonieform- und Stoffwechselmutanten geprüft. Trotz mehrmaliger Versuche konnte keine einzige Mutante gefunden werden.

Die Teilungsrate von Chlamydomonas-Zellen bei verschiedenen ÄMS-Konzentrationen

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde die Vermehrungsgeschwindigkeit bei Zugabe folgender ÄMS-Konzentrationen geprüft: 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,05, 0,15 und 0,25%. Dabei zeigte sich, daß eine ÄMS-Konzentration unter

0,02 % die Teilungsgeschwindigkeit kaum beeinflußt. Ein Zusatz von 0,02 % ÄMS zum Minimalmedium ermöglicht zwar eine normale Vermehrung der Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase, es bewirkt aber nach Erreichen der stationären Phase auffallende pathologische Veränderungen. So werden die zunächst homogen grünen Zellsuspensionen weiß (s. Abb. 1), wobei dieses allmähliche Weißwerden der Lösung von einem Zusammenklumpen der Zellen begleitet ist. Im mikroskopischen Bild (s. Abb. 2) erkennt man, daß die ausgeblichenen Zellen zwar noch Teilungen durchgeführt haben, das Ausschlüpfen der Tochterzellen aus der Muttermembran ist jedoch unterblieben. In den meisten Fällen sind 4 Tochterzellen zu erkennen. Nach Zugaben von 0,03 bzw. 0,05 % ÄMS zum

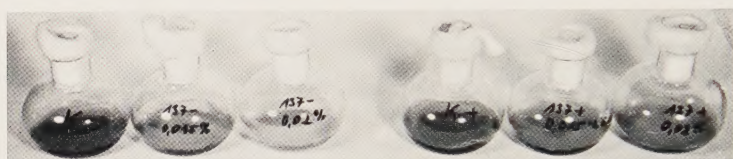


Abb. 1. Das Ausbleichen der *Chlamydomonas*-Kulturen nach ÄMS-Zugabe. Die Kulturen des Paarungstyp — sind empfindlicher als die des Paarungstyp +

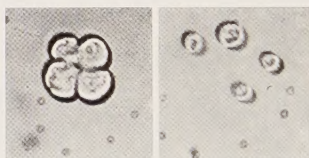


Abb. 2. Infolge ÄMS-Einwirkung können sich die gebildeten Tochterzellen nicht aus der Muttermembran befreien. Daneben Zellen der Kontrollkultur. Vergr. 800fach

Minimalmedium kommt es anfangs noch zu einer Zellvermehrung, aber bereits nach 3—4 Tagen beginnt das Verklumpen der Zellen. Gibt man 0,15 bzw. 0,25 % ÄMS hinzu, so wird die Zellvermehrung von vornherein unterdrückt. Besonders bei den Versuchen mit 0,02 und 0,03 % ÄMS zeigt sich wieder eine größere Empfindlichkeit der — Zellen (s. Abb. 1).

Bei den Ansätzen mit einer ÄMS-Zugabe von 0,005, 0,01 und 0,03 % wurden jeweils Proben entnommen, die nach entsprechenden Verdünnungen auf Agarplatten ausgestrichen wurden, um eventuell entstandene Mutanten festzustellen. Das Ausstreichen geschah am 6., 9., 12. und 15. Tag nach Inoculation in ÄMS-haltiges Medium. Dabei ergaben die Zellen, die 9 Tage lang in 0,03 % igem ÄMS-Medium suspendiert waren und deren Lösungen bereits völlig weiß und klumpig erschienen, auf Vollagar noch normale Kolonien. Die Proben, die am 12. und 15. Tag dem 0,03 % igen ÄMS-Medium entnommen waren, wuchsen auf Vollagar nicht mehr an. Die entstandenen Kolonien wurden auf Mutanten geprüft, sie erwiesen sich jedoch alle als unverändert.

Diskussion

ÄMS ist für höhere Pflanzen eines der wirksamsten mutagenen Agenzien. So waren bei *Oenothera* nach einer Samenbehandlung mit einer 0,1 % igen Lösung alle überlebenden Pflanzen der M_1 -Generation mutativ verändert, nach einer

Eizellbehandlung mit einer 1%igen Lösung waren 93,4% der überlebenden Pflanzen mutiert (KRESSEL und ARNOLD, 1967a und b). Bei niederen Organismen ist die mutagene Wirkung von ÄMS in der Regel nicht so überragend, doch erhielt beispielsweise NEČASEK (1967) bei Corynebakterien nach 18stündiger Einwirkung von 1,24%igem ÄMS immerhin eine Mutationsrate von 80%.

Die überraschend geringe Mutationsausbeute bei unseren Versuchen kann wohl am besten damit erklärt werden, daß ÄMS auf *Chlamydomonas*-Zellen eine starke toxische Wirkung ausübt, die die Gewinnung von Mutanten nahezu unmöglich macht. Nach BENDER und GAUL (1966) ist aber die Toxizität von ÄMS sogar gering, während die Hydrolyseprodukte des ÄMS, nämlich Methansulfonsäure und Äthylalkohol, sehr toxisch wirken. Da ÄMS bei unserer Versuchstemperatur von 25°C eine Hydrolyse-Halbwertszeit von etwa 48 Std besitzt, könnte der toxische Effekt bei den Experimenten mit Agarkulturen und bei denen zur Ermittlung der Vermehrungsrate auf die Wirkung der Hydrolyseprodukte zurückgeführt werden. Bei den Mutationsversuchen mit suspendierten *Chlamydomonas*-Zellen befanden sich die Algen aber höchstens 12 Std im ÄMS-Medium. Sie wurden anschließend mit Phosphat-Puffer gründlich gewaschen. Die auch hier festgestellte starke toxische Wirkung kann somit nicht von den Hydrolyseprodukten, sondern nur vom ÄMS selbst verursacht worden sein. Die von BENDER und GAUL (1966) behauptete geringe Toxizität von ÄMS wird für höhere Pflanzen zutreffen, sie hat aber für *Chlamydomonas reinhardtii* keine Gültigkeit.

Über die Art der toxischen Wirkung sind keine intensiven Untersuchungen durchgeführt worden. Wir haben nur festgestellt, daß eine Ausbleichung der Zellen stattfindet und daß die Tochterzellen dann nicht mehr in der Lage sind, sich aus der Muttermembran zu befreien. Bemerkenswert ist, daß diese pathologischen Veränderungen bis zu einem gewissen Grade reversibel sind. Zellen, die bereits 9 Tage in einem 0,03%igen ÄMS-Medium suspendiert waren, entwickelten auf ÄMS-freiem Vollmedium wieder normale Kolonien.

Selbstverständlich gibt es für den unerwartet geringen mutagenen Effekt von ÄMS gegenüber *Chlamydomonas* noch andere Erklärungsmöglichkeiten. So könnte man an die Tätigkeit eines spezifischen, enzymgesteuerten Reparatur-Mechanismus denken, der die in der prämutativen Phase abgelaufenen Veränderungen wieder korrigiert. Hinweise für einen solchen repair-Mechanismus bei *Chlamydomonas reinhardtii* glaubt LOPPE (1966) gefunden zu haben. Er konnte durch Methylmethansulfonat (MMS) die Überlebensrate dann auffallend erniedrigen, wenn er nach der MMS-Einwirkung die Zellsuspension auf 40°C erwärmte. Durch diese erhöhte Temperatur soll die Tätigkeit der Enzyme außer Kraft gesetzt werden, weshalb sich der MMS-induzierte Primärschaden voll auswirkt. Es bleibt jedoch zu bedenken, daß es sich bei diesem Beispiel nicht um die Korrektur eines genetischen Effektes handelt.

Die Zellen des Paarungstyps — waren in allen Fällen gegenüber ÄMS sensibler als die +-Zellen. Geringfügige Unterschiede in der genetischen Konstitution bewirken hier einen deutlichen Empfindlichkeitsunterschied. Solche Unterschiede sind auch bei höheren Pflanzen bereits festgestellt worden. So waren bei *Oenothera lamarckiana* die Gameten mit dem Genomkomplex I wesentlich ÄMS-sensibler als die mit dem Komplex B (KRESSEL und ARNOLD, 1967b). Derselbe komplexspezifische Unterschied zeigte sich übrigens auch nach Röntgenbestrahlung (KRAUTBLATTER und ARNOLD, 1967).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung unserer Arbeit.

Literatur

- BENDER, K., u. H. GAUL: Nachwäsche, Rücktrocknung und Lagerung bei ÄMS-behandelten Gerstensamen. Radiat. Bot. **6**, 505—518 (1966).
- KRAUTBLATTER, H., u. C. G. ARNOLD: Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Genome von *Oenothera berteriana*. Radiat. Bot. **7**, 283—287 (1967).
- KRESSEL, M., u. C. G. ARNOLD: Die mutagene Wirkung von Äthylmethansulfonat bei der komplexheterozygoten *Oenothera berteriana*. Züchter **37**, 364—371 (1967a).
- — Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Genome von *Oenothera berteriana* gegenüber Äthylmethansulfonat. Mutation Res. **4**, 797—804 (1967b).
- LEDERBERG, J., and E. M. LEDERBERG: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. **63**, 393—406 (1952).
- LEVINE, R. P., and W. T. EBERSOLD: The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Vererbungsl. **89**, 631—635 (1958).
- LOPPES, R.: Damage induced by methyl methansulfonate (MMS) in *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Vererbungsl. **98**, 193—202 (1966).
- NEČASEK, J.: Mutagenic effect of ethyl methansulfonate in *Corynebacterium*. Physiol. of Gene and Mutat. Express., Praha, 115 (1966).
- P. PIKÁLEK, and J. DROBNÍK: The mutagenic effect of prolonged treatment with ethyl methansulfonate. Mutation Res. **4**, 409—413 (1967).

Apothekerin H. RANNEBERG
Doz. Dr. C. G. ARNOLD
852 Erlangen, Schloßgarten 4

Die Wirkung von Chloramphenicol auf eine p-Aminobenzoesäure-Mangelmutante von *Chlamydomonas reinhardi*

H. RANNEBERG und C. G. ARNOLD

Eingegangen am 29. Dezember 1967

Summary

The effect of Chloramphenicol on a p-aminobenzoic acid requiring mutant of *Chlamydomonas reinhardi*

The influence of chloramphenicol on the growth of a p-aminobenzoic acid requiring mutant of *Chlamydomonas reinhardi* was investigated. It was found that first of all the antibiotic substance causes a growth-inhibition, no matter whether it is added to the complete medium or to the minimal medium + p-aminobenzoic acid. After this inhibitory period chloramphenicol is even able to replace the p-aminobenzoic acid. This suggests the ability of the mutant to decompose chloramphenicol and to transform it, among others, into p-aminobenzoic acid.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Chloramphenicol auf das Wachstum einer p-Aminobenzoesäure-Mangelmutante von *Chlamydomonas reinhardi* untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß das Antibiotikum zunächst eine Wachstumshemmung verursacht, gleichgültig ob es dem Maximalmedium oder dem Minimalmedium + p-Aminobenzoesäure zugegeben wird. Nach dieser Hemmungsperiode kann Chloramphenicol sogar p-Aminobenzoesäure ersetzen. Das zeigt, daß die Mutante in der Lage ist, Chloramphenicol abzubauen und daraus unter anderem p-Aminobenzoesäure freizusetzen.

Einleitung

Die isogame, heterothallische *Chlamydomonas reinhardi* hat sich in den letzten Jahren zu einem Standardobjekt genetischer und physiologisch-biochemischer Forschungen entwickelt. Wir testeten an diesem Objekt zunächst die Wirkung verschiedener mutagener Agenzien. Nachdem wir mit Äthylmethansulfonat überraschenderweise keine wesentliche Erhöhung der Mutationsrate erzielen konnten (RANNEBERG und ARNOLD, 1968), setzten wir mit wesentlich besserem Erfolg Nitrosamide ein. So erhielten wir unter anderem eine Mutante, die sich im Kreuzungsexperiment durch zwei besondere Eigenschaften auszeichnet. Es kommen in erstaunlicher Häufigkeit nicht-reziproke Rekombinationen vor, die ausnahmslos zu einer Bevorzugung des Wildtyps führen (ARNOLD und RANNEBERG, 1967). Diese bemerkenswerten Phänomene veranlassen uns, mit der genannten Mutante weitere Experimente durchzuführen. Um aber ein möglichst umfassendes Wissen über diese Mutante zu erlangen, möchten wir eine Begrenzung auf rein genetische Untersuchungen vermeiden. So soll in der vorliegenden Arbeit über die Wirkung von Chloramphenicol auf das Wachstum der Mutante berichtet werden.

Material und Methoden

Die als Untersuchungsobjekt benutzte Mutante gehört zum Stamm C 137 + von *Chlamydomonas reinhardi*. Sie wurde auf folgende Weise gewonnen: Eine 5 Tage alte Suspension von *Chlamydomonas*-Zellen wurde 8 Stunden lang mit einer 0,001 %igen Lösung von N-Methyl-N-Nitroso-N'-Nitroguanidin behandelt. Nach dem Abzentrifugieren und Auswaschen der Zellen mit Phosphat-Puffer wurde die Suspension verdünnt und dann auf Agarplatten ausgestrichen, die sogenanntes Maximalmedium enthielten. Die dort entstandenen Kolonien wurden zur Identifizierung von Mangelmутanten mit Hilfe der üblichen Stempelmethode auf Minimalagar übertragen.

Die Mutante ist durch folgende Kennzeichen charakterisiert: Sie ist im Gegensatz zum Wildtyp nicht imstande, auf Minimalagar zu wachsen. Nach Überimpfen aus dem Vollmedium verlieren die Zellen bald ihre grüne Farbe, sie werden weiß und gehen zugrunde. Der Zusatz von 0,005 mg p-Aminobenzoesäure zu 100 ml anorganischen Nährmedium bewirkt wieder ein normales Wachstum. Unsere Mutante ist also nicht in der Lage, p-Aminobenzoesäure selbst zu synthetisieren.

Die Vorstufe zur Bildung aromatischer Ringsysteme bei höheren Pflanzen und Mikroorganismen ist in der Regel die Shikimisäure. So konnte eine Mangelmутante von *Escherichia coli*, die Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure benötigt, durch alleinige Zugabe von Shikimisäure zum Wachstum gebracht werden (KARLSON, 1966). Bei unserer *Chlamydomonas*-Mutante bleibt die Anwendung von Shikimisäure ohne Erfolg, was darauf hindeutet, daß der genetische Block auf einer späteren Stufe, also auf dem Syntheseweg von der Shikimisäure zur p-Aminobenzoesäure, liegt.

p-Aminobenzoesäure-Mangelmутanten sind bei *Chlamydomonas reinhardi* bereits beschrieben worden (EBERSOLD et al., 1962). Doch sind diese mit der unsrigen nicht identisch. Unsere Mutante zeigt auf Minimalmedium nicht nur ein gehemmtes Wachstum, sondern gar kein Wachstum, weshalb sich eine Zugabe von Sulfanilamid zur völligen Unterdrückung der Zellteilungen erübrigt.

Bei der Bestimmung der Wachstumsrate wurden die Mutantenzellen vergleichsweise in folgenden Medien angezogen: flüssiges Minimalmedium, flüssiges Maximalmedium, Minimalmedium + p-Aminobenzoesäure, Minimalmedium + Chloramphenicol und Minimalmedium + p-Aminobenzoesäure + Chloramphenicol. Die Lösungen waren hinsichtlich des Chloramphenicols 10^{-4} molar. Während des Versuchs standen die Kolben auf einer Schüttelmaschine. Die Lichtintensität betrug 5000 Lux, in einigen Fällen 3000 Lux.

Ergebnisse

Aus der Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß die Mutante im Minimalmedium praktisch keine Vermehrung zeigt. Bei Zugabe von p-Aminobenzoesäure ist die Wachstumsrate dagegen normal. Sie entspricht etwa der Wachstumsgeschwindigkeit im Vollmedium. Wenn die Zellenzahl bei den Versuchen mit Vollmedium sogar manchmal etwas geringer war, so liegt das sicherlich daran, daß diese Versuchsserie zu einem anderen Zeitpunkt bei wesentlich geringerer Lichtintensität durchgeführt wurde. Alle anderen Experimente sind jedoch gleichzeitig durchgeführt worden. Gibt man dem Minimalmedium Chloramphenicol hinzu, dann wird das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Kontrollversuch mit Minimalmedium + p-Aminobenzoesäure zunächst nicht so stark gefördert; spätestens am 12. Tag wird der Kontrollwert wieder erreicht. In den Versuchen mit Minimalmedium + Chloramphenicol + p-Aminobenzoesäure macht sich anfangs sogar ein hemmender Einfluß bemerkbar. Doch auch hier ist spätestens am 12. Versuchstag die Zellenzahl der Kontrollen erreicht. Die Versuchsserie mit Minimal-

medium + Chloramphenicol + p-Aminobenzoesäure bringt ungefähr die gleichen Resultate wie die Experimente mit Minimalmedium + Chloramphenicol. Die zusätzliche Zugabe von p-Aminobenzoesäure bleibt ohne wesentliche Bedeutung.

Tabelle 1
Wachstum der Mutantenzellen in verschiedenen Nährmedien.
Anzahl je ml in:

Tage	Mi	Mi + C	Mi + pA	Mi + pA + C	Ma
0	$9,6 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$
3	$2,4 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$
6	$1,3 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$
9	$9,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$7,4 \times 10^6$
12	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6$
15	$1,9 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
18	$1,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
21	$2,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	verpilzt	$2,1 \times 10^7$

Mi = Minimalmedium, C = Chloramphenicol, pA = p-Aminobenzoesäure, Ma = Maximalmedium. Lichtintensität 5000 Lux, bei Ma 3000 Lux.

Aus diesen Versuchen geht einwandfrei hervor, daß unsere Mangelmutante anstelle von p-Aminobenzoesäure auch Chloramphenicol verwenden kann. Allerdings übt Chloramphenicol zunächst eine vorübergehende Hemmung aus, die auch durch gleichzeitige Zugabe von p-Aminobenzoesäure nicht beseitigt werden kann.

Entsprechende Ergebnisse erhielten wir auch mit Agarkulturen. Da diese jedoch quantitativ nicht auswertbar sind, wollen wir auf eine Besprechung verzichten. Zur Vollständigkeit wurde auch die Wachstumsrate von Wildtypzellen in Gegenwart von Chloramphenicol bestimmt. Es überrascht nicht, wenn auch hier eine hemmende Wirkung festgestellt wurde (s. Tab. 2).

Diskussion

Über die Wirkungsweise des Antibiotikums Chloramphenicol liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor, ohne daß es gelungen wäre, eine restlose Aufklärung zu erreichen. Es ist jedoch unbestritten, daß Chloramphenicol als Inhibitor in die Proteinsynthese eingreift, und zwar wird vermutlich die Ablösung der fertigen Polypeptidkette vom Ribosom verhindert. Dagegen geht unter dem Einfluß des Antibiotikums die Synthese der DNS und RNS weiter, wobei sich allerdings die Zusammensetzung der RNS ändert und es zur Anreicherung einer sogenannten Chloramphenicol-RNS kommt (ZÄHNER, 1965 und DELLWEG, 1966).

Daß diese meist an Bakterien untersuchte Chloramphenicol-Wirkung auch für *Chlamydomonas reinhardtii* Gültigkeit hat, konnte von JACOBSON, SALMON und LANSKY (1964) bestätigt werden. Auch sie stellten eine Unempfindlichkeit der DNS gegenüber Chloramphenicol fest, während die Proteinsynthese eindeutig gehemmt wird.

Unter diesen Gesichtspunkten ist die in unseren Versuchen aufgetretene anfängliche Verzögerung der Zuwachsrates gut zu verstehen. Dagegen erscheint es zunächst überraschend, daß diese Hemmung alsbald wieder beseitigt wird und daß dann Chloramphenicol anstelle von p-Aminobenzoesäure verwendet werden kann. Diese Tatsache bestätigt jedoch die Angaben von CZYGAN (1964), der den Abbau von Chloramphenicol durch *Chlorella ellipsoidea* beschrieben hat. Er konnte nach dreiwöchiger Kultur in der Nährlösung beziehungsweise im Algenextrakt außer p-Aminophenyl-2-Amino-1,3-Propandiol, p-Nitrophenyl-2-Amino-1,3-Propandiol, Äthanolamin auch p-Aminobenzaldehyd und p-Aminobenzoesäure nachweisen. Auf Grund unserer Ergebnisse ist nicht daran zu zweifeln, daß auch unsere *Chlamydomonas*-Mutante die Fähigkeit zum Abbau des Chloramphenicols besitzt und auf diese Weise ihren p-Aminobenzoesäurebedarf decken kann.

Tabelle 2
Wachstum der Wildtypzellen in verschiedenen Nährmedien.
Anzahl je ml in:

Tage	Mi	Mi + C
0	$8,3 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$
6	$6,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
9	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$
12	$1,8 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$
15	$2,0 \times 10^7$	$8,9 \times 10^6$
18	$1,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
21	$2,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
24	$2,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

Abkürzungen wie bei Tab. 1. Lichtintensität 3000 Lux.

Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die Fähigkeit des Chloramphenicol-Abbaus ausschließlich der p-Aminobenzoesäure-Mangelmutante zukommt, daß sie gewissermaßen als Ausgleich ihres Syntheseblocks spezifische Enzyme gebildet hat, die den Abbau ermöglichen. Diese Fähigkeit dürfte genau wie bei *Chlorella ellipsoidea* auch dem Wildtyp zukommen (s. Tab. 2). Damit ist allerdings nicht gesagt, daß der Abbau von Chloramphenicol stets im gleichen Maße vollzogen wird. Da die gebildete p-Aminobenzoesäure von der Mutante als Wachstoffsstoff benötigt wird, wird diese aus dem Medium entzogen. So wird das Gleichgewicht in Richtung der Abbauprodukte verschoben, was die Möglichkeit in sich birgt, daß der Chloramphenicol-Abbau schneller und vollständiger erfolgt als üblich.

CZYGAN (1966) berichtet von einem weiteren höchst interessanten Chloramphenicol-Effekt bei heterotrophen Mutanten von *Chlorella pyrenoidosa*. Diese Mutanten sind unfähig in anorganischen Medien zu wachsen. Fügt man jedoch Chloramphenicol hinzu, so treten nach 4 bis 8 Wochen Rückmutanten auf. Diese mutagene Wirkung ist um so überraschender, als Chloramphenicol nicht auf die DNS wirkt. Es bleibt aber zu bedenken, daß die Mutanten erst nach einer sehr langen Zeitspanne aufgetreten sind, in der

der Abbauprozess des Chloramphenicols abgeschlossen sein dürfte. Es muß deshalb die Möglichkeit geprüft werden, ob statt des Chloramphenicols nicht bestimmte Abbau-produkte des Antibiotikums mutationsauslösend wirken. Mit entsprechenden Untersuchungen haben wir bereits begonnen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung unserer Untersuchungen.

Literatur

- ARNOLD, C. G., und H. RANNEBERG: Nicht-reziproke Rekombination bei *Chlamydomonas reinhardi*. Ber. Dt. Bot. Ges. 80, 512–516 (1967).
- CZYGAN, F. C.: Untersuchungen über den Abbau von Chloramphenicol durch Grünalgen. Naturwissensch. 51, 541–542 (1964).
- Effect of Chloramphenicol on Mutants of *Chlorella pyrenoidosa*. Nature 212, 960 (1966).
- DELLWEG, H.: Antibiotika und Hormone – ihre Wirkung auf die Biosynthese von Nucleinsäuren und Proteinen. Molekularbiologie. Frankfurt (1966).
- EBERSOLD, W. T., R. P. LEVINE, E. E. LEVINE and M. A. OLMSTED: Linkage maps in *Chlamydomonas reinhardi*. Genetics 47, 531–543 (1962).
- JACOBSEN, B. S., R. J. SALMON and L. L. LANSKY: Antimitotic effects of Chloramphenicol and other inhibitory agents in *Chlamydomonas*. Exp. Cell Res. 36, 1–13 (1964).
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Stuttgart (1966).
- ZÄHNER, H.: Biologie der Antibiotika. Berlin (1965).

Apothekerin H. RANNEBERG und Dr. C. G. ARNOLD, Botanisches Institut der Universität,
852 Erlangen, Schloßgarten 4.

Ein Beitrag zur Genetik der Streptomycin-Resistenz
bei *Chlamydomonas reinhardi*

H. RANNEBERG und C. G. ARNOLD

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Eingegangen am 10. Januar 1968

A Contribution to the Heredity of Streptomycin-Resistance in Chlamydomonas reinhardi

Summary. Two of the streptomycin-resistant strains of *Chlamydomonas reinhardi*, obtained by the gradient-technic, were further investigated. Strain *sr-f* was resistant to 100 γ streptomycin/ml, strain *sr-n* was still resistant to 500 γ streptomycin/ml. In crosses to the wildtype, strain *sr-n* was shown to be of normal mendelian inheritance. Thus it differs from the mutant with the same resistance level obtained by SAGER which is characterized by a nonkaryotic inheritance.

Both mutants, *sr-n* and *sr-f*, did not originate from streptomycin induced mutations. Rather the antibiotic was acting as a selectiv agent, providing the possibility to select the a priori-resistant cells.

Only the vegetative cells of the mutant *sr-n* were fully resistant. In the gametes, the zygotes and the daughter cells produced by the zygotes, the inhibitory influence of the streptomycin still persists.

Zusammenfassung. Mit Hilfe der Gradiententechnik erhielten wir zwei streptomycinresistente Stämme von *Chlamydomonas reinhardi*. Der Stamm *sr-f* war gegen 100 γ Streptomycin/ml resistent, der Stamm *sr-n* noch gegenüber 500 γ Streptomycin/ml. Durch Kreuzung mit dem Wildtyp konnte gezeigt werden, daß der Stamm *sr-n* eine normal mendelnde Mutante darstellt. Sie unterscheidet sich demzufolge von der Sagerschen Mutante gleichen Resistenzniveaus, die sich durch einen außerkaryotischen Erbgang auszeichnet.

Unsere beiden Mutanten sind nicht durch streptomycininduzierte Mutationen entstanden. Das Antibiotikum wirkte vielmehr als selektierendes Agens, mit dessen Hilfe man die von vornherein resistenten Zellen isolieren kann.

Bei der Mutante *sr-n* hatten nur die vegetativen Zellen Resistenzeigenschaft. Auf Gameten, Zygoten und auf die aus den Zygoten hervorgehenden Tetradenzellen übte Streptomycin weiterhin einen hemmenden Einfluß aus.

Genetische Experimente unter Verwendung von Streptomycin wurden an der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardi* erstmals von SAGER (1954) beschrieben. Ihr gelang es, nach Streptomycineinwirkung streptomycinresistente Stämme zu erhalten. Diese waren untereinander jedoch nicht einheitlich, sondern unterschieden sich hinsichtlich Induktionsmodus, Resistenzniveau und in der Art, die Resistenzeigenschaft auf die sexuelle Nachkommenschaft zu übertragen.

In dem einen Fall wirkt Streptomycin als selektierendes Agens, das die a priori in der Kultur vorhandenen resistenten Zellen isoliert. Diese Zellen zeigen eine Resistenz bis zu einer Streptomycinkonzentration von 100 γ je ml Nährlösung. Sie erhielten deshalb die Bezeichnung *sr-100*. Nach Kreuzung mit einem streptomycinsensitiven Partner ergibt sich eine normale 2:2-Spaltung.

Im anderen Fall wurde die Resistenz durch Streptomycin im Sinne einer Mutationsauslösung induziert (SAGER, 1962). Diese Mutanten zeigen eine Widerstandsfähigkeit bis zu 500 γ Streptomycin je ml Nährlösung, sie sind charakterisiert durch einelterliche Vererbung. Das heißt, die Resistenz wird auf alle Nachkommen übertragen, wenn der resistente Partner dem Paarungstyp + angehört. Gehört der resistente Elter dem Paarungstyp — an, dann sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, alle Nachkommen einheitlich sensitiv. Dieser außerkaryotische Erbgang überrascht um so mehr als *Chlamydomonas reinhardtii* ein isogamer Organismus ist. Die Mutante *sr-500* ist unseres Erachtens das erste absolut sichere Beispiel einer extrachromosomalen Mutation, die durch mutagene Agenzien ausgelöst worden ist. Solche extrachromosomalen Mutanten mit dem Merkmal Streptomycinresistenz sind nicht nur durch Streptomycin, sondern später auch durch N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin induziert worden (GILLHAM, 1956a). Auch das weitere Studium der Streptomycinresistenz hat unsere Kenntnisse über nichtchromosomale Vererbung wesentlich erweitert (SAGER u. RAMANIS, 1963, 1966; GILLHAM u. LEVINE, 1962; GILLHAM, 1963a, 1963b, 1965b).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich in erster Linie mit einer weiteren streptomycinresistenten Mutante, die sich jedoch von den vorhin geschilderten Typen unterscheidet. Hinsichtlich des Resistenzniveaus entspricht sie der außerkaryotischen Mutante *sr-500*, doch ist ihr Vererbungsmodus einwandfrei karyotisch.

Material und Methoden

Unsere Mutanten gehören zum Stamm 137C + von *Chlamydomonas reinhardtii*. Sie wurden auf folgende Weise gewonnen: In Phosphatpuffer suspendierte + Zellen wurden in Petrischalen ausgestrichen, die zur Hälfte mit Vollagar, zur anderen Hälfte mit Vollagar + 100 γ Streptomycin/ml gefüllt waren. Durch diese Gradiententechnik entsteht eine Hemmzone, in der die normalen sensitiven Zellen eben noch wachsen können. Bei den Kolonien, die jenseits dieser Zone entstehen, ist zumindest der Verdacht auf Streptomycinresistenz gegeben. Die Überprüfung des Befundes erfolgte durch erneutes Ausplattieren auf Streptomycinagar. Von den recht zahlreich entstandenen resistenzverdächtigen Kolonien wurden zwei ausgewählt, die mit *sr-n* und *sr-f* bezeichnet wurden. Der Stamm *sr-n* war außerordentlich nahe der Hemmzone gebildet worden, während *sr-f* in weitem Abstand, also fern von der Hemmzone entstanden war (siehe Abb. 1). Beide wurden zunächst auf Vollagar + 100 γ Streptomycin/ml übertragen. In weiteren Versuchen wurde die Streptomycinkonzentration erhöht.

Bezüglich der Nährmedien richteten wir uns weitgehend nach LEVINE u. EBERSOLD (1958). Während die Versuche mit vegetativen Zellen auf 2%igen Agarmedium durchgeführt wurden, wurde für die Reifung und Keimung der Zygoten ein 4%iger Agar verwendet. Der Zusatz von Streptomycin zum Agar erfolgte stets nach dem Autoklavieren. Es wurde Streptomycinsulfat Bayer® verwendet.

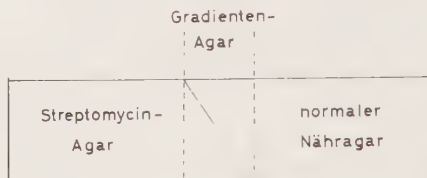


Abb. 1. Die Entstehung der Mutanten *sr-n* und *sr-f* auf einer Gradientenagarplatte.



Abb. 2. 2:2 Spaltungsergebnis der Kreuzung *sr-n* + x Wildtyp —

Auch die Kreuzungstechnik wurde an anderer Stelle bereits ausführlich geschildert (RANNEBERG u. ARNOLD, 1968). Es sei hier zusätzlich vermerkt, daß die Zygotenreifung und -keimung nur auf streptomycinfreiem Agar möglich war. Die aus den Zygoten ausschließenden Zellen wurden deshalb mit Hilfe eines dünnen Drahtes, dem am vorderen Ende ein winziges Kügelchen angeschmolzen war, voneinander getrennt. Die daraus entstandenen Kolonien wurden nach 5 Tagen, als sie eben mit dem bloßen Auge sichtbar waren, mittels einer Nadel auf Streptomycinagar übertragen. Dort wurde die Nachkommenschaft je einer Zygote in einer Reihe angeordnet (siehe Abb. 2).

Ergebnisse

Der auf der Streptomycinseite der Gradientenplatte isolierte Stamm *sr-f* wurde wiederholt auf Agarplatten ausgestrichen, die ein Vollmedium + 100 γ Streptomycin/ml enthielten. Die Zellen zeigten ein unvermindertes Wachstum. Dagegen führte das Übertragen der Zellen auf Agarplatten, die 200 γ Streptomycin/ml enthielten, zur Abtötung aller Zellen. Der Stamm *sr-f* stellt also eine Mutante dar, die gegen 100 γ Streptomycin/ml resistent ist.

Der Stamm *sr-n* war in unmittelbarer Nähe der Hemmzone entstanden. Das erstmalige Übertragen auf Vollmedium + 100 γ Streptomycin/ml führte zum Ausbleichen und Absterben der Kolonie bis auf einen kleinen Sektor, der intensiv grün blieb. Die Zellen dieses Sektors, beziehungsweise deren Nachkommen, wurden wiederholt auf 100 γ Streptomycin/ml getestet. Sie erwiesen sich als voll resistent. Nach 3wöchiger Kultur auf diesem Streptomycinagar wurde die Streptomycinmenge zunächst auf 200 γ /ml, dann auf 300 γ /ml und schließlich auf 500 γ /ml erhöht. Es entstanden stets voll lebensfähige Kolonien. Dagegen wirkte eine Streptomycinmenge von 750 γ /ml letal. Der Stamm *sr-n* stellt also eine Mutante dar, die noch gegen 500 γ Streptomycin/ml resistent ist.

Mit den Zellen des Stammes *sr-n* wurden Kreuzungsversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die auf Streptomycinagar angezogenen Zellen für solche Experimente nicht geeignet waren. Es kam zwar noch zu einer Gametenbildung, und diese Gameten kopulierten auch noch mit den Gameten des Wildtyps, es unterblieb jedoch die normale Zygotenentwicklung. Das heißt, die Volumenvergrößerung der Zygoten und die Ausbildung einer dicken Zygotenmembran fand nicht statt. Die Zygoten konnten deshalb von den ungepaarten Zellen nicht mehr unterschieden werden.

Verwendete man jedoch für die Kreuzungen Mutantenzellen, die auf Vollmedien gezogen waren, die keinen Streptomycinzusatz enthielten, so bekam man in ausreichendem Maße Zygoten, die von denen der Kontrollkreuzung nicht zu unterscheiden waren. Die so gewonnenen Zygoten verblieben in den ersten Versuchsserien (siehe Tabelle) während ihrer Reifungsperiode auf reinem Vollmedium, mit

Tabelle. *Ergebnisse der Kreuzung sr-n + x Wildtyp —. I = Zygoten reiften auf Vollagar und keimten auf Streptomycinagar; II = Zygoten reiften und keimten auf Vollagar*

	übertragene Zygoten	Anzahl der gekeimten Zygoten	gebildeten Kolonien	getesteten Zygoten	2:2 Spaltungen	aberranten Spaltungen
I	160	107	—	—	—	—
II	714	613	563	481	469	12

Beginn der Keimungsphase wurden sie auf Agarplatten gebracht, die Vollmedium + 500 γ Streptomycin/ml enthielten. Von den insgesamt 160 übertragenen Zygoten keimten 107, das sind 66,9%. Die ausgeschlüpften Zellen wurden voneinander getrennt. Es kam jedoch in keinem Fall zur Bildung einer Kolonie.

Bei den anderen Versuchsserien wurde die Zygoten auch zur Keimung auf streptomycinfreies Medium gebracht. Von 714 übertragenen Zygoten keimten in diesem Fall 613 = 85,9% (siehe Tabelle). Die aus diesen

Zygoten hervorgehenden Zellen waren in der Regel imstande, normale Kolonien auszubilden. Es sei allerdings darauf verwiesen, daß 16,7% der Zygoten Folgekolonien hervorbrachten, die gegenüber den Kontrollen ein gehemmtes Wachstum zeigten.

Aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Streptomycinresistenz des Stammes *sr-n* keine unumschränkte Gültigkeit hat. Die diploide Phase und die unmittelbar aus ihr hervorgegangenen haploiden Zellen sind nach wie vor gegenüber Streptomycin empfindlich. Die Streptomycinresistenz gilt nur für die haploiden vegetativen Zellen.

Um die Art der Spaltung feststellen zu können, war es notwendig, die aus den Zygoten hervorgehenden Zellen auf streptomycinhaltigen Agar zu übertragen, wobei zu erwähnen ist, daß aus den Zygoten manchmal 4, in anderen Fällen 8 Zellen entstanden. Die jeweils 4, beziehungsweise 8 Folgekolonien von 481 Zygoten wurden in dieser Weise auf Resistenz getestet (siehe Tabelle). Es zeigte sich, daß 469 — 97,5% der Zygotennachkommen normal 2:2, bzw. 4:4, spalteten (siehe Abb. 2). 12 Tetraden zeigten aberrante Spaltungszahlen. Dabei wurde 7mal eine vermehrte Anzahl von resistenten Kolonien festgestellt, 5mal überwogen die sensitiven Kolonien. Da in diesen Fällen keine Kontrollmarker getestet wurden, ist es nicht möglich, diese irregulären Spaltungsergebnisse im Sinne einer nicht-reziproken Rekombination (RANNEBERG u. ARNOLD, 1968) zu deuten.

Die Kreuzungsergebnisse beweisen, daß es sich bei dem Stamm *sr-n* um eine normale karyotische Mutante handelt.

Diskussion

Die Anwendung der Gradiententechnik ermöglicht das Auffinden überraschend vieler resistenter *Chlamydomonas*-Stämme. Da die resistenten Kolonien sich ohne wesentliche Verzögerung entwickeln, darf man annehmen, daß in unserem Fall Streptomycin nicht als Mutagen fungierte, sondern als ein selektierendes Agens, das die bereits vorhandenen resistenten Zellen isoliert.

Es erscheint bemerkenswert, daß die verschiedenen streptomycinresistenten Stämme in genetischer Hinsicht nicht einheitlich sind. Genau wie SAGER u. TSUBO (1961), fanden auch wir Kolonien, die sich bezüglich des Resistenzniveaus deutlich unterscheiden. Des weiteren gibt es bei Stämmen mit gleichem Resistenzniveau Unterschiede hinsichtlich der Art und Weise ihrer genetischen Fixierung. So stellen die von SAGER beschriebenen Stämme, die gegenüber 500 γ Streptomycin/ml resistent sind, außerkaryotische Mutanten dar. Der von uns eliminierte Stamm mit gleichem Resistenzgrad ist dagegen eine normal mendelnde Mutante.

Das Resistenzniveau kann auch durch Modifikationsgene wesentlich beeinflußt werden. So fanden SAGER u. TSUBO (1961) ein mendelndes

amplifier-Gen, daß den Resistenzgrad sowohl bei der karyotischen *sr-100* Mutante als auch bei der außerkaryotischen *sr-500* Mutante auf 1500 γ Streptomycin/ml erhöht. Die Existenz solcher Modifikationsgene konnte bei unserer Mutante noch nicht exakt nachgewiesen werden. Es sei nur erwähnt daß ca. 17% der Zygoten Folgekolonien lieferten, die in ihrer Größe zwischen den sensitiven und resistenten Klonen lagen. Bei diesen hatte zwar eine Zellvermehrung stattgefunden, doch war sie im Vergleich zu den Kontrollen deutlich gehemmt. Eine entsprechende genetische Analyse ist noch nicht erfolgt.

Bei der von uns untersuchten Mutante *sr-n* hatten nur die vegetativen Zellen Resistenzeigenschaft. Dagegen sind die Gameten und vor allem die Zygoten nach wie vor streptomycinempfindlich. Die Gameten der auf Streptomycinagar angezogenen Zellen waren zwar imstande, normal zu kopulieren, doch der nachfolgende Reifungsprozeß der Zygoten war entscheidend gestört. Aber auch diejenigen Zygoten, die von Gameten stammten, die aus streptomycinfrei gezogenen Kulturen hervorgegangen sind, waren weiterhin streptomycinempfindlich. So betrug die Zygotenkeimungsrate auf Streptomycinagar nur 66,9%, während die Keimungsrate auf antibioticafreiem Medium bei 85,9% lag. Wichtiger ist jedoch die Tatsache, daß die auf Streptomycinmedium entstandenen haploiden Tetradenzellen ausnahmslos nicht in der Lage waren, Kolonien zu bilden.

Die diploide Phase, einschließlich der aus ihr hervorgehenden haploiden Tetradenzellen, sind also weiterhin streptomycinempfindlich. Die Ursache dieser spezifischen Sensivität ist uns nicht bekannt. Wir können nur aussagen, daß ein störender Einfluß auf die Meiose vermutlich nicht gegeben ist. Denn die Entstehung der Tetraden zeigt, daß der Meiosemechanismus intakt geblieben ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- GILLHAM, W.: The nature of exceptions to the pattern of uniparental inheritance for high level Streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **48**, 431—439 (1963a).
- Transmission and segregation of a nonchromosomal factor controlling Streptomycin resistance in diploid *Chlamydomonas*. *Nature* (Lond.) **200**, 294 (1963b).
- Induction of chromosomal and nonchromosomal mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* with N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine. *Genetics* **52**, 529—537 (1965a).
- Linkage and recombination between nonchromosomal mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **54**, 1560—1567 (1965b).
- and R. P. LEVINE: Studies on the origin of Streptomycin resistant mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **47**, 1463—1474 (1962).
- LEVINE, R. P., u. W. T. EBERSOLD: The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Vererbungsl.* **89**, 631—635 (1958).

- RANNEBERG, H., and C. G. ARNOLD: Nicht-reziproke Rekombination als Erklärung aberranter Spaltungsergebnisse bei *Chlamydomonas reinhardtii*. Molec. Gen. Genetics **101** (1968).
- SAGER, R.: Mendelian and nonmendelian inheritance of Streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 356—363 (1954).
- Streptomycin as a mutagen for nonchromosomal genes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **48**, 2018—2026 (1962).
- , and L. RAMANIS: The particulate nature of nonchromosomal genes in *Chlamydomonas*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **50**, 260—268 (1963).
- — Recombination of nonchromosomal genes in *Chlamydomonas*. Genetics **53**, 1053—1061 (1966).
- , and Y. Tsubo: Genetic analysis of Streptomycin-resistance and dependence in *Chlamydomonas*. Z. Vererbungsl. **92**, 430—438 (1961).

Apotheker HELGA RANNEBERG,
Doz. Dr. CARL-GEROLD ARNOLD
Botanisches Institut der Universität
852 Erlangen, Schloßgarten 4

Nicht-reziproke Rekombination als Erklärung aberranter Spaltungsresultate bei *Chlamydomonas reinhardi*

H. RANNEBERG und C. G. ARNOLD

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Eingegangen am 16. Februar 1968

Non-reciprocal Recombination to Explain Observed Aberrant Segregation

Summary. In crosses of a p-aminobenzoic acid requiring mutant of *Chlamydomonas reinhardi* with the wildtype we observed besides the expected 4:4 segregation a surprisingly high frequency of aberrant segregation, all of which preferentially led to the wildtype. The only possible explanation of this finding is a non-reciprocal recombination, as mutations, trisomy and the loss of a tetrad cell with following additional division of a sister cell can be excluded. The molecular mechanism of non-reciprocal recombinations is still unknown. Nevertheless our findings are best understood, if we accept the hybrid-DNA model of HOLLIDAY, especially because this model is not only able to explain the 5:3 and 6:2 tetrads, but also the 7:1 and 8:0 segregations which occur at a much lower rate.

The frequency of non-reciprocal recombinations could be reduced by irradiating zygotes at the very beginning of the germination period. If the X-rays were applied 6½ hours after induction of the germination, no clear aberrant segregation could be found.

The reduction of the frequency of non-reciprocal recombinations by X-rays leads to the conclusion, that the mechanism of mutation and conversion are not identical. On the other hand we known many mutagenic substances which also cause non-reciprocal recombination. Thus it can be supposed that both the mechanisms have some steps in common.

Einleitung

Im Rahmen unserer Mutationsversuche an *Chlamydomonas reinhardi* erhielten wir unter anderen eine Mutante, die erst nach Zugabe von p-Aminobenzoessäure zum Nährmedium ein normales Wachstum zeigt. Die Kreuzungen mit dem Wildtyp ergaben in den meisten Fällen eine normale Mendelspaltung.

Darüber hinaus kamen in beachtlicher Häufigkeit auch aberrante Spaltungsresultate vor. Es zeigte sich, daß diese abweichenden Ergebnisse durch nicht-reziproke Rekombinationen verursacht wurden. Solche nichtreziproken Rekombinationen sind bisher in erster Linie an Pilzen beobachtet worden (ESSER, 1967). Es gibt nur wenige Beispiele, bei denen diese Erscheinung auch bei Organismen anderer taxonomischer Bereiche vorkommt. Aus diesem Grund ist es nicht unwichtig, wenn entsprechende Ergebnisse nun auch bei *Chlamydomonas reinhardi* festgestellt werden konnten.

Das Studium der nichtreziproken Rekombinationen ist auch deshalb von Bedeutung, weil wir noch immer keine gesicherten Kenntnisse über das molekulare Geschehen des Rekombinationsvorganges besitzen. Zwar existieren heute relativ brauchbare Modellvorstellungen (WHITEHOUSE, 1963, 1967; HASTINGS und WHITEHOUSE, 1964; WHITEHOUSE und HASTINGS, 1965; HOLLIDAY, 1964), doch ist eine Überprüfung dieser Modelle anhand möglichst vieler experimenteller Daten dringend erforderlich.

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit den Stämmen 137 C+ und 137 C— von *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt. Außer diesen Wildtypstämmen wurden noch zwei mendelnde Mutanten eingesetzt. Die Mutante *pab* ist nicht in der Lage, p-Aminobenzoesäure zu synthetisieren. Ihre Gewinnung sowie die wesentlichen Charakteristika wurden von RANNEBERG und ARNOLD (1968) bereits beschrieben. Auch die Mutante *thi* wurde nach dem gleichen Induktionsmodus gewonnen, aber während *pab* durch N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin induziert wurde, haben wir *thi* durch Einsatz von N-Nitrosoimidazolidon erhalten, und zwar durch eine 40 min lange Behandlung mit einer 0,1 %igen Lösung. Über die mutationsauslösende Wirkung solcher Nitrosamide liegen zahlreiche Untersuchungen der Marquardt-Schule vor (MARQUARDT, ZIMMERMANN und SCHWAIER, 1964; ZIMMERMANN, SCHWAIER, v. LAER, 1965; SCHWAIER, ZIMMERMANN, v. LAER, 1965; SCHWAIER, 1965). Das wichtigste Merkmal der Mutante *thi* ist die Thiaminbedürftigkeit. Ohne Zugabe von 0,1 mg Thiamin zu 100 ml Minimalmedium ist ein normales Wachstum nicht möglich. Während jedoch die *pab*-Mutante auf Minimalmedium gar keine Zellvermehrung zeigt, ist bei der *thi*-Mutante noch ein geringfügiges Wachstum feststellbar.

Bezüglich der Nährmedien richteten wir uns weitgehend nach den Vorschriften von LEVINE und EBERSOLD (1958b). Die Kreuzungsversuche wurden in Anlehnung an LEVINE und EBERSOLD (1958a) nach folgender Methode vorgenommen: Vor Versuchsbeginn wurden die +- und --Zellen vom Agar abgeimpft und in sterilem destillierten Wasser getrennt suspendiert. Dort verblieben sie eine Nacht hindurch, wurden aber während dieser Zeit belichtet. Durch dieses Aushungern werden die vegetativen Zellen zu Gameten umgestimmt. Am nächsten Morgen wurden die Suspensionen in solchen Anteilen gemischt, daß ungefähr gleich viele +- und --Gameten vorhanden sind. Nach ca. 25–30 min ist die Fusion der Gameten erfolgt, weshalb die Suspension nunmehr auf Vollagar ausgestrichen wurde. Die Agarplatten wurden dann 18–24 Std im Licht und anschließend 5 Tage im Dunkeln gehalten. Nach dieser Zeit ist die Reifung der Zygoten abgeschlossen.

Zur Auslösung der Zygotenkeimung mußten die Zygoten auf ein neues Vollmedium übertragen werden. Dazu wurde ein äußerst dünner Draht benutzt, der am vorderen Ende zu einer winzigen Schlaufe gebogen wurde. Der übrige Draht war in einem Schmelzpunktröhrchen eingeschmolzen, das wiederum in einem Verlängerungsstift eingeschraubt war. Mit diesem Gerät wurden die Zygoten einzeln übertragen. Bei einer anderen Methode wurde das vordere Ende des Drahtes zu einem winzigen Köpfchen verformt. Damit wurden die Zygoten auf ein Häufchen zusammengerollt und dieses Häufchen wurde durch Ausstechen des Agarblockes gemeinsam übertragen. Auf der neuen Agarplatte wurden die Zygoten wieder auseinandergerollt und gleichmäßig auf der Platte verteilt.

Die Keimung der Zygoten erfolgte nur im Licht. Nach 15–24 Std sind die haploiden Zoosporen aus den Zygoten geschlüpft. Die Zeitspanne ist weitgehend abhängig von der genetischen Konstitution der Zygoten. Die aus den Zygoten entstandenen Zellen wurden nun wieder mit Hilfe des Köpfchendrahtes voneinander getrennt, damit aus jedem Zygotenprodukt eine gesonderte Kolonie hervorgeht. Die Zahl dieser Zygotenprodukte betrug meist 8, manchmal auch 4 bzw. 16. Auch diese Zahl wird von der genetischen Beschaffenheit der Zygoten bestimmt.

Nach einem 8–10tägigen Wachstum wurde die genetische Konstitution der entstandenen Klone festgestellt. Zu diesem Zweck wurden sie auf Minimalagar und, da es sich in den meisten Fällen um Kreuzungen mit der *pab*-Mutante handelte, auf Minimalagar + p-Aminobenzoesäure ausgestrichen. Bei Verwendung der *thi*-Mutante wurde natürlich auf Minimalmedium und auf Minimalmedium + Thiamin getestet. Nach Kreuzung *pab* × *thi* mußte neben den genannten Nährböden noch auf Minimalmedium + p-Aminobenzoesäure + Thiamin getestet werden. Des weiteren wurde bei allen entstandenen Klonen durch erneuten Kopulationsversuch mit Teststämmen der Paarungstyp bestimmt.

Die Versuchstemperatur betrug 25°C, die Lichtintensität 5000 Lux. Die Röntgenbestrahlungsversuche wurden mit der Röhre AGW 61 des Gerätes Siemens-Kristalloflex durchgeführt. Die Strahlendosis betrug 770 R/min, bei 50 kV, 50 mA bei Petrischalen mit gepreßtem Glas, 22 mA bei Anumbraschalen, der Abstand Röhre—Agaroberfläche betrug 10 cm.

Ergebnisse

a) Kreuzungsversuche

Die aus den Mutationsversuchen hervorgegangene Mutante *pab* gehörte dem Paarungstyp $+$ an. Sie wurde mit $-$ -Zellen des Wildtyps gekreuzt, also *pab* $\times$ *pab*⁺. Soweit wie möglich wurde bei den jeweiligen Zygotennachkommen die Tetradenanalyse durchgeführt. Allerdings bestand die Nachkommenschaft einer Zygote nur in den selteneren Fällen aus 4 Zellen, meistens wurden 8, zuweilen sogar 16 Zygotenprodukte gezählt (s. Tabelle 1). Bei Vorhandensein von nur 4 Tetradenzellen sind neben der normalen 2:2 Spaltung noch die aberranten Spaltungsergebnisse 3:1 und 4:0 möglich. Liegen dagegen 8 Tetradenzellen vor, so können

Tabelle 1. Anzahl der aus den Zygoten entstandenen Zoosporen bei den verschiedenen Kreuzungen

Zahl der Produkte	<i>pab</i> $\times$ <i>pab</i> ⁺	<i>pab</i> ⁺ $\times$ <i>pab</i>	<i>pab</i> $\times$ <i>pab</i>
4	29 = 17,6%	14 = 9,0%	96 = 68,1%
8	105 = 63,6%	119 = 76,3%	44 = 31,2%
16	31 = 18,8%	23 = 14,7%	1 = 0,7%

neben dem normalen 4:4 Ergebnis auch die Resultate 5:3, 6:2, 7:1 und 8:0 vorkommen. Da aber die 3:1 und 4:0 Spaltungen den 6:2 bzw. 8:0 Spaltungen entsprechen, haben wir die ersteren nicht immer gesondert registriert. Bei Vorhandensein von 16 Zygotenprodukten gibt es natürlich noch viel mehr Möglichkeiten. Da jedoch die Isolierung von 16 Zygotenprodukten ziemlich schwierig ist, haben wir diese Fälle nur selten ausgewertet.

Bei der Nachkommenschaft von 38 Zygoten der Kreuzung *pab* $\times$ *pab*⁺ konnte die Tetradenanalyse durchgeführt werden. Dabei erhielten wir in 26 Fällen (s. Tabelle 2) die erwartete 2:2, bzw. 4:4 Spaltung, aber 7 Zygoten = 18,4%

Tabelle 2. Die Anzahl der aberranten Tetraden bei den Kreuzungen mit der *pab*-Mutante

Kreuzung	Zahl der getesteten Zygoten	Zahl der normalen Tetraden	Zahl der aberranten Tetraden
<i>pab</i> $\times$ <i>pab</i> ⁺	38	26	7 = 18,4%
<i>pab</i> ⁺ $\times$ <i>pab</i>	40	33	7 = 17,5%
	78	59	14 = 17,8%
<i>pab</i> $\times$ <i>pab</i>	34	34	0 = 0,0%

lieferten irreguläre Spaltungsresultate. Je einmal konnten die Resultate 8:0, 7:1 und 5:3 festgestellt werden, zweimal das Resultat 6:2. Die beiden restlichen Fälle konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, weil jeweils eine der haploiden Zoosporen keine Kolonie gebildet hatte. Auf diese Weise kamen wir zu den Resultaten 3:0 und 5:2. Es kann deshalb nicht entschieden werden, ob hier in Wirklichkeit die Resultate 4:0 (= 8:0) oder 3:1 (= 6:2) bzw. 5:3 oder 6:2 vorliegen. An der Abweichung vom theoretischen Spaltungsverhältnis kann jedoch kein Zweifel bestehen. Von Bedeutung ist die Tatsache, daß die Abweichungen

zugunsten des Wildtyps gehen, bei allen irregulären Spaltungen war die *pab*-Mutante in der Minderheit.

In den genannten Beispielen, bei denen die Zygoten bezüglich des *pab*-Merkmals aberrante Spaltungszahlen lieferten, zeigte der Paarungstyp die erwartete Aufspaltung von $4+ : 4-$. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß darüber hinaus in dieser Kreuzungsserie auch der Paarungstyp immerhin 5mal vom theoretischen $4:4$ Verhältnis abwich. 4mal kam es dabei gleichzeitig zu einer irregulären Spaltung des *pab*-Merkmals, während 1mal die *pab*-Spaltung normal war.

Durch die Kreuzung $(pab)+ \times (pab)^{-}$ erhielten wir auch Mutantenzellen mit dem Paarungstyp $-$. Auf diese Weise war die reziproke Kreuzung $(pab)^{+}+ \times (pab)^{-}$ möglich. In dieser Versuchsserie konnten von 40 Zygoten die Tetraden analysiert werden. In 33 Fällen wurde die normale $4:4$ Spaltung festgestellt, die restlichen 7 Zygoten = 17,5% (s. Tabelle 2) lieferten aberrante Verhältniszahlen, wobei das Resultat $5:3$ allein 5mal vorkam. In einem anderen Fall konnte zwischen einem $4:0$ (= $8:0$) und $3:1$ (= $6:2$) Ergebnis nicht unterschieden werden. Schließlich lieferte eine Analyse von 16 Zygotenprodukten das aberrante Verhältnis $9:7$.

Auch hier kam es ausnahmslos zu einer Bevorzugung des Wildtyps, bei allen irregulären Spaltungen blieb der Mutantentyp in der Minderheit. Des weiteren ist hier zu beachten, daß in dieser Kreuzungsserie eine irreguläre Aufspaltung des Paarungstyps nicht beobachtet wurde.

Wenn wir die Ergebnisse der beiden reziproken Kreuzungen zusammenziehen (s. Tabelle 2), dann ergibt sich folgendes: Von 78 analysierten Zygotennachkommen wurden 14mal aberrante Spaltungszahlen festgestellt, das sind immerhin 17,8%.

Von den Kontrollkreuzungen $(pab)+ \times (pab)^{-}$ konnten 34 Zygotennachkommen geprüft werden. Zieht man die Kontrollkreuzungen der Röntgenbestrahlungsversuche mit ein (s. Tabelle 3), so erhöht sich die Zahl der Tetradenanalysen auf 130. In allen Fällen bestand die Nachkommenschaft nur aus

Tabelle 3. Die Anzahl der aberranten Tetraden bei den Kreuzungen mit der *pab*-Mutante nach Bestrahlung der Zygoten

Kreuzung	Bestrahlungszeitpunkt (Zahl der Std. nach Beginn der Zygoten- keimung)	Zahl der getesteten Zygoten	Zahl der normalen Tetraden	Zahl der aberranten Tetraden
<i>pab</i> ⁺ × <i>pab</i>	0	55	52	3 = 5,5%
<i>pab</i> × <i>pab</i>	0	68	68	0 = 0,0%
<i>pab</i> ⁺ × <i>pab</i>	cirka 6½	70	69	1 = 1,4%
<i>pab</i> × <i>pab</i>	cirka 6½	28	28	0 = 0,0%

Mutantenzellen, es wurde kein einziger Wildtypklon festgestellt. Aberrante Spaltungen findet man also nur in den Tetraden heterozygoter Zygoten.

Es sei erwähnt, daß in dieser Kreuzung viel häufiger nur 4 Tetradenzellen auftraten als bei der Kreuzung $(pab) \times (pab)^{+}$. Die dort vorkommenden 16 Zygotenprodukte wurden bei der Kreuzung $(pab) \times (pab)$ nur ein einziges Mal festgestellt (s. Tabelle 1).

In anderen Versuchen wurde die Mutante *pab* mit der Thiaminmangelmutante *thi* gekreuzt, also $(pab, thi^+) \times (pab^+, thi)^-$. Hier konnten von 42 Zygoten Tetradenanalysen durchgeführt werden. Durch das gleichhäufige Vorkommen des Wildtyps, der beiden Elterntypen und der Doppelmutterante konnte gezeigt werden, daß die Genorte *pab* und *thi* nicht gekoppelt sind. In 2 Fällen = 4,7% konnten bezüglich des *pab*-Merkmals aberrante Spaltungen festgestellt werden, einmal lautete das Ergebnis 8:0, das andere Mal 6:2, beide Male wurde wiederum das Wildtypmerkmal bevorzugt. Hinsichtlich des *thi*-Merkmals konnten keine Abweichungen vom normalen 4:4 Ergebnis festgestellt werden.

Das häufige Vorkommen aberranter Resultate bei Kreuzungen mit der *pab*-Mutante, veranlaßte uns, die Rückmutationsrate zu bestimmen. Sie liegt bei vegetativ wachsenden Zellen bei 10^{-7} .

b) Kreuzungsversuche mit Zygotenbestrahlung

In weiteren Experimenten sollte geprüft werden, inwieweit sich die Spaltungsresultate experimentell beeinflussen lassen. Es wurden deshalb Zygoten der Kreuzung Wildtyp $\times$ Mutante, also $(pab^+) \times (pab)^-$ mit Röntgenstrahlen behandelt. In der ersten Versuchsserie wurden die Zygoten nach Beendigung der Reifungsperiode bestrahlt, unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zygoten zur Induktion der Keimungsphase auf neuen Nähragar übertragen. Nach einer Bestrahlung von 5390 R (770 R/min) kam es in keinem einzigen Fall zur Zygotenkeimung. Wir arbeiteten deshalb mit einer Bestrahlungsdosis von 3080 R, die die Keimung der Zygoten zumindest nicht ungünstig beeinflußte. Es konnten von insgesamt 55 Zygotennachkommen (s. Tabelle 3) die Tetradenanalyse durchgeführt werden, davon zeigten 52 die normale 4:4 Spaltung und nur 3 Zygoten lieferten abweichende Spaltungsergebnisse. Ein Ergebnis lautete 6:2, während bei den anderen infolge Ausfall eines Klons nicht zwischen 5:3 und 6:2 bzw. 9:7 und 10:6 entschieden werden konnte. Durch die Röntgenbestrahlung ist also die Zahl der aberranten Spaltungsresultate erniedrigt worden, sie beträgt hier nur noch 5,5%. Die 68 getesteten Zygotennachkommen der Kontrollkreuzung $(pab)^+ \times (pab)^-$ ergaben ausschließlich *pab*-Mutanten, Wildtypkolonien fehlten vollkommen.

In der zweiten Versuchsserie wurden die Zygoten erst nach Übertragung auf neuen Nähragar bestrahlt. Die Bestrahlungszeit lag zwischen 6 Std 15 min und 6 Std 45 min nach Induktion der Keimungsphase. Von 70 getesteten Zygotennachkommen zeigten 69 die normale 4:4 Spaltung. Nur eine einzige Zygote lieferte ein unklares Bild. Bei dieser hatten 4 Klone eindeutig Wildtypcharakter, 2 Klone wuchsen auf Minimalmedium nicht, sie waren also p-Aminobenzoesäure bedürftig, 2 weitere Klone zeigten auf Minimalmedium ein schwaches Wachstum. Es besteht die Möglichkeit, daß es sich hier um röntgeninduzierte Mutanten handelt. Auf jedem Fall liegt in dieser Versuchsserie die Zahl der aberranten Spaltungen unter 1,5%, vermutlich ist sie sogar noch geringer. Die Röntgenbestrahlung nach ca. 6 Std nach Keimbungsbeginn hat also die aberranten Resultate noch weiter verringert. Von der Kontrollkreuzung $(pab)^+ \times (pab)^-$ wurden 28 bestrahlte Zygoten getestet. Sie ergaben wiederum nur Nachkommen des Mutantentyps.

Diskussion

a) Mögliche Ursachen der aberranten Spaltungen

Das auffallendste Ergebnis unserer Untersuchungen ist das häufige Vorkommen aberranter Spaltungszahlen und die Tatsache, daß die von der Norm abweichenden Resultate ausnahmslos zu einer Bevorzugung des Wildtyps führen.

Rückmutationen können hierfür nicht verantwortlich gemacht werden, weil die Rückmutationsrate mit 10^{-7} zu gering ist und weil aus den *pab* $\times$ *pab* Kreuzungen niemals Wildtypzellen entstanden sind.

Einige Phänomene ließen sich mit Trisomie erklären. Die gelegentliche Eliminierung des überzähligen Chromosoms in einer $2n+1$ -Zygote würde die einseitige Reversion von *pab* zu *pab*⁺ verständlich machen. Das Ausbleiben von Wildtypzellen in den *pab* $\times$ *pab*-Kontrollkreuzungen ließe sich dadurch erklären, daß in der tetrasomen Zygote die beiden zusätzlichen Chromosomen konjugieren können und deshalb der Chromosomenverlust nicht eintritt. Eine cytologische Prüfung der Chromosomenzahl ist nicht durchgeführt worden, zumal über die normale Chromosomenzahl von *Chlamydomonas reinhardi* noch keine Klarheit herrscht (EBERSOLD, LEVINE, LEVINE und OLMSTED, 1962). Aber auch ohne cytologische Untersuchungen muß man die Annahme von Trisomie fallenlassen, weil sie nur die 8:0 und 6:2 Spaltungen erklären kann, dagegen nicht die 7:1 und die besonders häufigen 5:3 Ergebnisse. Auch müßte es im Falle von Trisomie bei den Kreuzungen (*pab*, *thi*⁺) $\times$ (*pab*⁺, *thi*) gelegentlich zu Änderungen des *thi*⁺ und des *thi* Merkmals kommen.

Auch die Annahme chromosomaler Aberrationen führt zu keiner plausiblen Erklärung. Der Kürze wegen sollen diese Möglichkeiten hier nicht diskutiert werden.

Weiterhin muß geprüft werden, ob die abweichenden Spaltungsergebnisse nicht durch Ausfall einer Tetradenzelle mit nachfolgender Zusatzteilung einer Geschwisterzelle erklärt werden können. Das teilweise Absterben von haploiden Tetradenzellen ist mehrfach festgestellt worden und da man annehmen darf, daß die Mutantenzellen empfindlicher als die Wildtypzellen sind, wäre dadurch auch die einseitige Bevorzugung des Wildtyps verständlich. Ein weiteres Indiz zugunsten dieser Möglichkeit stellt die Tatsache dar, daß gelegentlich auch aberrante Paarungstypspaltungen festgestellt wurden, wenngleich diese nur dann beobachtet worden sind, wenn das *pab*-Merkmal mit dem Paarungstyp + verbunden war (s. Tabelle 2).

Aber auch diese Vorstellungen führen zu Widersprüchen: Aus einer Zygote entstehen immer nur 4, 8 oder 16 Zygotenprodukte (s. Tabelle 1). Es ist nicht vorstellbar, daß durch das Absterben einer Zelle eine Geschwisterzelle zu einer erneuten Teilung induziert wird und vor allem, daß von dieser Induktion immer nur eine Geschwisterzelle betroffen werden soll. Zudem bedingt unsere Versuchsanordnung einen synchronisierten Keimungsablauf, weshalb eine zusätzliche DNS-Synthese in einer einzigen Zelle nicht möglich ist.

Setzen wir jedoch den Fall, daß trotz dieser Einwände der Ersatz einer Tetradenzelle durch zusätzliche Teilung einer Geschwisterzelle möglich ist. In einer Häufigkeit von 50% haben die Tetradenzellen die Konstitution *wi*+, *wi*+, *mu*−, *mu*− (*wi* = Wildtyp, *mu* = Mutante). Der Ersatz einer *mu*−-Zelle durch *wi*− (s. Tabelle 4) führt zu einer irregulären Spaltung des Mutantenmerkmals und des Paarungstyps. Erfolgt der Ersatz durch eine *mu*−-Zelle, so

Tabelle 4. Die Spaltungen des Mutantenmerkmals und des Paarungstyps bei Ausfall einer Tetradenzelle und nachfolgender Zusatzteilung einer Geschwisterzelle

					Spaltung des Mutanten- merkmals	Spaltung des Paarungstyps
50%	wi +	wi +	mu —	mu —		
33,3%	wi +	wi +	wi +	mu —	irregulär	irregulär
16,7%	wi +	wi +	mu —	mu —	normal	normal
50%	wi +	wi —	mu +	mu —		
16,7%	wi +	wi —	wi —	mu —	irregulär	irregulär
16,7%	wi +	wi —	wi +	mu —	irregulär	normal
16,7%	wi +	wi —	mu —	mu —	normal	irregulär

bleibt das Ergebnis normal. Ebenfalls mit einer Häufigkeit von 50% haben die Tetradenzellen die Konstitution *wi*+, *wi*—, *mu*+, *mu*—. Der Ersatz von *mu*+ durch *wi*— ergibt wieder eine aberrante Spaltung des Mutantenmerkmals und des Paarungstyps. Eine Ersatzteilung von *wi* + führt zu einer irregulären Spaltung des Mutantenmerkmals bei normaler Verteilung des Paarungstyps. Erfolgt der Ersatz durch *mu*—, dann ist die Mutantenspaltung normal, die Paarungstypverteilung jedoch irregulär.

Aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Fälle mit gleichzeitiger aberranter Spaltung des Mutantenmerkmals und des Paarungstyps (= 50%) theoretisch 3mal häufiger auftreten müssen als die Fälle, bei denen nur das Mutantenmerkmal irregulär spaltet, während der Paarungstyp normal verteilt wird (16,7%). Die tatsächlichen Befunde liegen jedoch ganz anders. 14mal wurde eine irreguläre Spaltung des *pab*-Merkmals bei gleichzeitiger Normalverteilung des Paarungstyps festgestellt, während gleichzeitige irreguläre Spaltung des *pab*-Merkmals und des Paarungstyps nur 4mal beobachtet wurde. 1mal war die *pab*-Spaltung normal, während der Paarungstyp abnormal spaltet. Somit scheidet auch diese Erklärungsmöglichkeit aus.

b) Nichtreziproke Rekombination als Ursache der aberranten Spaltungen

Unseres Erachtens bleibt zur Erklärung der abweichenden Spaltungsresultate nur die Annahme einer nichtreziproken Rekombination. Sie allein ist imstande, die beobachteten Phänomene zufriedenstellend zu erklären (ARNOLD und RANNEBERG, 1967). Da die genetische Analyse noch nicht weit genug fortgeschritten ist, entsprechende Markierungsgene also noch fehlen, können wir keine Aussage darüber machen, ob es sich hierbei um einen inter- oder intragenischen Austausch handelt. Doch erwiesen sich nichtreziproke Rekombinationen, die man auch als Konversionen bezeichnet, bisher stets als intragenische Vorgänge.

Allerdings lieferten unsere Untersuchungen gewisse Fakten, die nach den bisherigen Erfahrungen über nichtreziproke Rekombinationen ungewöhnlich sind. In erster Linie muß dabei auf die erstaunlich hohe Rekombinationsrate von 17,8% hingewiesen werden. Wenngleich diese Zahl auf Grund der relativ wenigen Tetradenanalysen nicht als absolut gesichert angesehen werden darf, kann an einer außergewöhnlich hohen Rekombinationsrate kein Zweifel bestehen. Normalerweise liegt die Häufigkeit nichtreziproker Rekombinationen bei nur etwa 0,1% (ESSER, 1967). Unser Ergebnis steht jedoch nicht ganz allein. Neuerdings wurde von EMERSON und YU-SUN (1967) auch bei *Ascobolus immersus* eine ungewöhnlich hohe Konversionsrate von 17—18% festgestellt.

Wie es zu solch hohen Rekombinationsraten kommen kann, ist uns nicht bekannt. Man muß aber beachten, daß sowohl die reziproken als auch die nichtreziproken Rekombinationen genetisch kontrolliert werden können, wie das z.B. von JESSOP und CATCHESIDE (1965) an

Neurospora crassa und von EMERSON und YU-SUN (1967) an *Ascobolus immersus* festgestellt werden konnte. So gibt es bei *Neurospora* ein Rekombinationsgen, das gewisse Allelrekombinationen auf das 10fache ansteigen läßt. Bisher haben wir bei *Chlamydomonas reinhardi* noch kein Gen nachweisen können, das für die erhöhte Rekombinationsauslösung verantwortlich wäre. Im Gegenteil, die Zygoten der Mutantenkreuzung (pab , thi^+) $\times$ (pab^+ , thi) lieferten wesentlich weniger aberrante Spaltungsergebnisse. Es besteht deshalb ein gewisser Verdacht, daß hier eine genetisch kontrollierte Reduktion der Konversionsrate vorliegt.

Eine weitere Besonderheit unserer Resultate ist die einseitige Richtung der Rekombinationen. Alle Abweichungen von der normalen 4:4 Spaltung gehen ausnahmslos zugunsten des Wildtyps. Die Tatsache, daß z.B. 5:3 und 3:5 Spaltungen nicht in gleicher Häufigkeit vorkommen, wurde bei Pilzen schon öfter beobachtet. So fanden KITANI, OLIVE und EL-ANI (1961) bei *Sordaria fimicola* eine Bevorzugung des Wildtyps, KRUSZEWSKA und GAJEWSKI (1967) bei *Ascobolus immersus* dagegen auch eine Bevorzugung des Mutantentyps. Eine solche absolute Bevorzugung des Wildtyps, wie wir sie erhielten, ist zumindest außerordentlich selten und sollte zum Gegenstand weiterer Untersuchungen gemacht werden.

Der molekulare Mechanismus des Rekombinationsvorganges ist nach wie vor unbekannt. Lange Zeit hat das „copy choice Modell“ eine Rolle gespielt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß wesentliche Voraussetzungen dieses Modells nicht den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen. So sind die Rekombinationsvorgänge nicht mit der DNS-Replikation gekoppelt (CHIANG, KATES und SUEOKA, 1965; ABEL, 1967), ferner ist die Replikationsweise der DNS auch bei *Chlamydomonas reinhardi* semikonservativ (SUEOKA, 1960) und nicht konservativ.

Dagegen entspricht die Hybrid-DNS Hypothese von WHITEHOUSE (1963) und von HOLLIDAY (1964) viel mehr den experimentellen Befunden. Obwohl für beide Vorstellungen der experimentelle Beweis noch aussteht, folgen wir vorzugsweise dem Holliday-Modell, deren wesentlichste Schritte folgende sind:

1. Paarung homologer, aber heteroalleler DNS-Moleküle;
2. reziproker Austausch einfacher DNS-Stränge und damit Entstehung einer Hybrid-DNS;
3. ist aus strukturellen Gründen eine Basenpaarung nunmehr unmöglich, dann kann es zur Korrektur kommen, indem eine der nichtkomplementären Basen ausgetauscht wird. Dieser Austausch ist identisch mit dem eigentlichen Konversionsvorgang.

Mit Hilfe dieses einfachen Modells sind wir in der Lage, nicht nur die relativ häufig vorkommenden 6:2 und 5:3 Spaltungen zu erklären, sondern auch die wesentlich selteneren 7:1 und 8:0 Spaltungen. Solche 7:1 und 8:0 „Tetraden“ sind nicht nur bei unseren Untersuchungen aufgetreten, sondern vereinzelt auch bei *Saccharomyces* (ROMAN, 1956), *Sordaria* (KITANI, OLIVE und EL-ANI, 1962; FIELDS und OLIVE, 1967), *Neurospora* (CASE und GILES, 1964; STRICKLAND, 1961) und *Ascobolus* (PASZEWSKI, 1967). Dieses Modell zeigt darüber hinaus, weshalb die 6:2 und 5:3 Spaltungen wesentlich häufiger sind. In diesen Fällen genügt der Austausch zwischen zwei DNS-Molekülen; bei einfacher Korrektur lautet das Ergebnis 5:3, bei zweifacher Korrektur 6:2. Bei den 7:1 und 8:0 Spaltungen müssen dagegen alle vier DNS-Doppelstränge am Austausch beteiligt sein, und das dürfte ein recht seltenes Ereignis darstellen. Darüber hinaus kommen die Ergebnisse erst dann zustande, wenn drei oder alle vier Hybridstellen korrigiert werden (s. Abb. 1). Schließlich sei noch an die 9:7-Spaltung erinnert (s. S. 30).

Auch sie ist ohne Schwierigkeiten zu deuten, wenn wir annehmen, daß in diesem Fall die sich paarenden Chromosomen jeweils vier DNS-Doppelstränge besaßen. Dann genügt zur Erklärung bereits ein einfacher Austausch mit nachfolgender Korrektur.

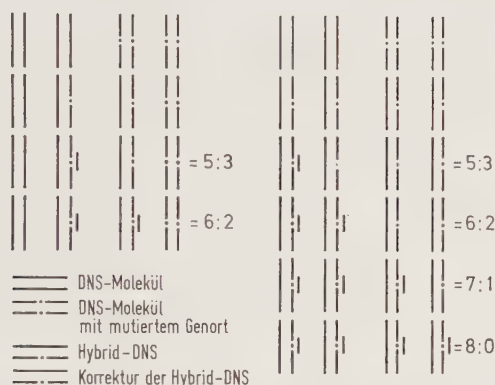


Abb. 1. Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge bei der nichtreziproken Rekombination

c) Experimentelle Beeinflussung der nichtreziproken Rekombinationen

Es gibt eine ganze Reihe von Agentien, die in der Lage sind, nichtreziproke Rekombinationen auszulösen. In vielen Fällen sind sie gleichzeitig in der Lage, reziproke Rekombinationen und Mutationen zu induzieren, wie etwa UV-Licht, Lostverbindungen, salpetrige Säure, usw. (MARQUARDT, 1967). Es gibt aber auch Substanzen, wie etwa Fluordesoxyuridin und Fluoruracil, die nur die crossing-over Werte erhöhen, die nichtreziproken Rekombinationen dagegen unbeeinflusst lassen (BECCARI, MODIGLIANI, MORPURGO, 1967).

Intensive Untersuchungen wurden bereits an *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. So konnte HOLLIDAY, (1966, 1967) feststellen, daß UV-Licht dann die Konversionshäufigkeit erhöht, wenn man im Stadium der DNS-Synthese bestrahlt. Offenbar ändert das UV-Licht die DNS, so daß es zur Bildung von Hybrid-DNS kommt. Aber auch alkylierende mutagene Substanzen wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin, N-Nitroso-N-Methylurethan, N-Nitroso-Imidazolidon-2, N-Nitroso-N-methyl-caprylamid, sind in der Lage, am gleichen Objekt Konversionen auszulösen (ZIMMERMANN, SCHWAIER, v. LAER, 1966; ZIMMERMANN und SCHWAIER, 1967; ZIMMERMANN, 1967). Wir müssen allerdings beachten, daß es sich bei *Saccharomyces* um mitotische Konversionen handelt und so ist es zumindest denkbar, daß diese Substanzen in erster Linie die mitotische Paarung fördern, anstatt direkt rekombinieren zu wirken.

Bei *Chlamydomonas reinhardtii* gibt es nach LAWRENCE (1965), DAVIES (1966), DAVIES und LAWRENCE (1967) zwei sensible Entwicklungsstadien, in denen sowohl die Gen- als auch die Allelrekombination beeinflusst werden kann. Das erste Stadium liegt vor Beginn der Meiose, es ist wohl mit dem Zeitpunkt der DNS-Synthese identisch. Das zweite Stadium liegt in der meiotischen Prophase. LAWRENCE (1967) konnte durch γ -Bestrahlung der ersten Phase eine Erniedrigung der Genrekombination, aber eine Erhöhung der Allelrekombination erreichen. Die Bestrahlung des zweiten Stadiums brachte sowohl bei den crossing-over Werten als auch bei den Konversionen eine Erhöhung.

Bei unseren Untersuchungen wurden die Zygoten unmittelbar bei Keimungsinduktion und $6\frac{1}{4}$ — $6\frac{3}{4}$ Std nach Keimungsbeginn mit Röntgenstrahlen behandelt. Der erste Bestrahlungstermin liegt demzufolge vor dem Stadium der DNS-Replikation (SUEOKA, CHIANG und KATES, 1967) und selbstverständlich auch vor dem Beginn der Meiose. Der zweite Termin ist nicht so genau definiert. Er liegt etwa zwischen DNS-Synthese und Meiose.

Im Gegensatz zu LAWRENCE (1967) konnten wir in beiden Fällen eine Reduzierung der nichtreziproken Rekombinationen feststellen. Allerdings war die Versuchsanordnung in beiden Fällen nicht gleich. Während LAWRENCE mit einer γ -Strahlendosis von 6000 R bei einer Dosisleistung von 3000 R/min arbeitete, benutzten wir Röntgenstrahlen, und zwar 3080 R bei einer Dosisleistung von 770 R/min. Dosen über 5000 R erwiesen sich in unseren Versuchen als letal.

Die Reduzierung der nichtreziproken Rekombinationen durch Röntgenstrahlen zeigt jedoch, daß der Konversionsmechanismus mit dem Mutationsmechanismus nicht identisch ist. Andererseits haben wir bereits auf die rekombinogene Potenz verschiedener mutagener Agentien (s. S. 35) hingewiesen. Dies bedeutet andererseits, daß beide Mechanismen sich nicht vollkommen unterscheiden, sondern daß ihnen bestimmte Vorgänge gemeinsam sind. Aber gerade dies wäre ein weiteres Indiz für die Richtigkeit des Holliday-Modells, bei denen das eigentliche Konversionsereignis durch Basenaustausch zustandekommt, ein Vorgang, der vergleichbar ist mit dem Ersatz von Basenanaloga bei der Entstehung von Mutanten.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- ABEL, W. O.: Intergenische Rekombination und Chromosomenreduplikation. Ber. dtsh. bot. Ges. **80**, 517—522 (1967).
- ARNOLD, C. G., u. H. RANNEBERG: Nicht-reziproke Rekombination bei *Chlamydomonas reinhardtii*. Ber. dtsh. bot. Ges. **80**, 512—516 (1967).
- BECCARI, E., P. MODIGLIANI, and G. MORPURGO: Induction of inter- and intragenic mitotic recombination by fluorodeoxyuridine and fluorouracil in *Aspergillus nidulans*. Genetics **56**, 7—12 (1967).
- CASE, M. E., and H. GILES: Allelic recombination in *Neurospora*: Tetradanalysis of a three point cross within the pan-2 locus. Genetics **49**, 529—540 (1964).
- CHIANG, K. S., I. R. KATES, and N. SUEOKA: Meiotic DNA replication mechanism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics **52**, 434—435 (1965).
- DAVIES, D. R.: The comparative effects of a mono- and a bifunctional alkylating agent on recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Vererbungsl. **98**, 61—70 (1966).
- , and C. W. LAWRENCE: The mechanism of recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. The influence of inhibitors of DNA synthesis on intergenic recombination. Mutation Res. **4**, 147—154 (1967).
- EBERSOLD, W. T., R. P. LEVINE, E. E. LEVINE, and M. A. OLMSTED: Linkage maps in *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics **47**, 531—543 (1962).
- EMERSON, S., and C. C. YU-SUN: Gene conversion in the Pasadena strain of *Ascomobolus immersus*. Genetics **55**, 39—47 (1967).
- ESSER, K.: Pilze als Objekte genetischer Forschung. Ber. dtsh. bot. Ges. **80**, 453—469 (1967).
- FIELDS, W. G., and L. S. OLIVE: The genetics of *Sordaria brevicollis*. III. Gene conversion involving a series of hyaline ascospore color mutants. Genetics **57**, 483—493 (1967).

- HASTINGS, P. J., and H. L. K. WHITEHOUSE: A polaron model of genetic recombination by the formation of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature (Lond.)* **201**, 1052—1054 (1964).
- HOLLIDAY, R.: A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res. Camb.* **5**, 282—304 (1964).
- Studies on mitotic gene conversion in *Ustilago*. *Genet. Res. Camb.* **8**, 323—337 (1966).
- Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of *Ustilago*. *Mutation Res.* **4**, 275—288 (1967).
- JESSOP, A. P., and D. G. CATCHESIDE: Interallelic recombination at the *his.-I* locus in *Neurospora crassa* and its genetic control. *Heredity* **20**, 237—256 (1956).
- KITANI, Y., L. S. OLIVE, and A. S. EL-ANI: Transreplication and crossing over in *Sordaria fimicola*. *Science (N.S.)* **134**, 668—669 (1961).
- — — Genetics of *Sordaria fimicola* V. Aberrant segregation at the *g* locus. *Amer. J. Bot.* **49**, 697—706 (1962).
- KRUSZEWSKA, A., and W. GAJEWSKI: Recombination within the *y* locus in *Ascobolus immersus*. *Genet. Res. Camb.* **9**, 159—177 (1967).
- LAWRENCE, C. W.: The effect of dose duration in the influence of irradiation on recombination in *Chlamydomonas*. *Mutation Res.* **2**, 487—493 (1965a).
- Influence of non-lethal doses of radiation on recombination in *Chlamydomonas reinhardi*. *Nature (Lond.)* **206**, 789—791 (1965b).
- Influence of non-lethal doses of radiation on allelic recombination in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genet. Res. Camb.* **9**, 123—127 (1967).
- LEVINE, R. P., and W. T. EBERSOLD: Gene recombination in *Chlamydomonas reinhardi*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **23**, 101—109 (1958a).
- — The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chlamydomonas reinhardi*. *Z. Vererbungsl.* **89**, 631—635 (1958).
- MARQUARDT, H.: Genetische Änderungen durch Chemikalien. 4. Zusammenfassung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **80**, 497—501 (1967).
- F. K. ZIMMERMANN, u. R. SCHWAIER: Die Wirkung krebsauslösender Nitrosamine und Nitrosamide auf das *ad₆₋₄₅* Rückmutationssystem von *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Vererbungsl.* **95**, 82—96 (1964).
- PASZEWSKI, A.: A study on simultaneous conversions in linked genes in *Ascobolus immersus*. *Genet. Res. Camb.* **10**, 121—126 (1967).
- RANNEBERG, H., u. C. G. ARNOLD: Die Wirkung von Chloramphenicol auf eine p-Aminobenzoessäure-Mangelmutante von *Chlamydomonas reinhardi*. *Z. Pflanzenphysiol.* **59**, 7—11 (1968).
- ROMAN, H.: Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 175—185 (1956).
- SCHWAIER, R.: Vergleichende Mutationsversuche mit sieben Nitrosamiden im Rückmutationstest an Hefen. *Z. Vererbungsl.* **97**, 55—67 (1965).
- F. K. ZIMMERMANN, and U. v. LAER: The effect of temperature on the mutation induction in yeast by N-alkylnitrosamides and nitrous acid. *Z. Vererbungsl.* **97**, 72—74 (1965).
- STRICKLAND, W. N.: Tetrad analysis of short chromosome regions of *Neurospora crassa*. *Genetics* **46**, 1125—1141 (1961).
- SUEOKA, N.: Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **46**, 83—91 (1960).
- K. S. CHIANG, and I. R. KATES: Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardi*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. molec. Biol.* **25**, 47—66 (1967).
- WHITEHOUSE, H. L. K.: A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature (Lond.)* **199**, 1034—1040 (1963).
- An operator model of crossing over. *Nature (Lond.)* **211**, 708—715 (1966).
- , and P. J. HASTINGS: The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model. *Genet. Res. Camb.* **6**, 27—92 (1965).

- ZIMMERMANN, F. K.: Genetische Änderungen durch Chemikalien. 3. Nicht-reziproke mitotische Rekombination. Ber. dtsch. bot. Ges. **80**, 492—496 (1967).
- , and R. SCHWAIER: Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Gen. Genetics **100**, 63—76 (1967).
- , and U. v. LAER: The influence of pH on the mutagenicity in yeast of N-methyl-nitrosamides and nitrous acid. Z. Vererbungsl. **97**, 68—71 (1965).
- — — Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrosamides. Z. Vererbungsl. **98**, 230—246 (1966).

Apothekerin H. RANNEBERG

Dozent Dr. C. G. ARNOLD

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

852 Erlangen

Lebenslauf

- 16.4.1938 geb. in Kemnath-Stadt/Opf. als Tochter von
Georg Hornung, Bäckermeister † und
Bernhardine Hornung geb. Partheymüller
- 1944 - 1948 Besuch der Volksschule in Kemnath/Opf.
- 1948 - 1951 Oberrealschule der Englischen Fräulein in
Regensburg
- 1951 - 1957 Städt.Realgymnasium für Mädchen in Bayreuth
- 18.7.1957 Reifeprüfung am Realgymnasium in Bayreuth
- 1957 - 1959 Praktikantenzeit in der Engel-Apotheke in
Marktredwitz/Ofr.
- 1959 - 1963 Pharmaziestudium an der Friedrich-Alexander-Uni-
versität Erlangen-Nürnberg
- 18.11.1963 Pharmazeutisches Staatsexamen
- 1964 - 1967 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Deutschen
Forschungsgemeinschaft und Ausführung der Promo-
tionsarbeit bei Herrn Univ.-Doz. Dr.C.G.Arnold
am Botanischen Institut der Universität Erlangen-
Nürnberg
- 11.4.1966 Verheiratung mit dem Apotheker und Medizinalassi-
stenten Dr.med. Karl Menno Ranneberg

